LUNDBLAD, O. 1941. Die Hydracarinenfauna Südbrasiliens und Paraguays. *Svensk. Vetenskapsakad. Handling Stockholm* 19: 1-183.

LUNDBLAD, O. 1951. Vorläufige Beschreibung einiger ostafrikanischer Hydracarinen. *Ent. Tidskr.* 72: 157-161.

VIETS, K. 1936. Wassermilben oder Hydracarina (Hydrachnellae und Halacaridae). *In Dahl: Tierwelt Deutschlands* 31/32: 1-652.

WALTER, C. 1944. Die Hydracarinen der Ybbs. *Int. Rev. Hydrobiol.* 43: 281-367.

Georges Bühlmann. — Vitellogenin in adulten Weibchen der Schabe *Nauphoeta cinerea* — Immunologische Untersuchungen über Herkunft und Einbau. (Mit 6 Abbildungen)[1]

Abteilung für Zoophysiologie,
Zoologisches Institut der Universität Bern

Ovovivipare Schaben, wie *Nauphoeta cinerea* oder *Leucophaea maderae* weisen einen typischen Sexualzyklus auf, der durch die beiden Ereignisse der Ovulation und der Jungenablage charakterisiert wird. Während der Eireifungsphase ist der Organismus des Weibchens ganz auf die Entwicklung einer neuen Oocytengeneration ausgerichtet. Während der Trächtigkeit, bis die ausgetragenen Jungtiere den Brutsack der Mutter verlassen, bleibt die Ausbildung der nächsten Oocyten unterdrückt.

Die Eier von *Nauphoeta cinerea* sind sehr dotterreich. Hauptaufgabe für das Eireifungsweibchen wird es sein, für die Produktion von genügend Dottermaterial zu sorgen. Zwar synthetisieren die Follikelzellen Protein (WYSS-HUBER und LÜSCHER 1972), doch reicht deren Leistung nicht aus, um volles Wachstum der Eier zu garantieren. Es müssen also extraovarielle Quellen für ihre Aufbaustoffe bestehen.

Um die Verhältnisse eingehender zu studieren, habe ich zunächst die Zusammensetzung der Haemolymphe untersucht. Kaninchen wurden mit Haemolymphe aus Eireifungsweibchen immunisiert. Mit dem gewonnenen Serum wurde die Haemolymphe von Männchen und Weibchen im Ouchterlony-Test (BACKHAUSZ 1967) verglichen. Es gibt mehrere gemeinsame Antigene bei Männchen und Weibchen. Weibchen weisen jedoch eine einzelne Bande auf, die in der Männchen-

[1] Mit Unterstützung durch Schweiz. Nationalfonds-Kredit Nr. 3.633.71 an Prof. M. Lüscher.

haemolymphe nicht vorkommt: die Präzipitationslinie wird nicht abgelenkt, sie läuft direkt in das Antigenloch mit Männchenblut (Abb. 1). Es handelt sich dabei um ein weibchenspezifisches Protein, wie es auch mit anderen Methoden (Disc-Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel, SCHEURER 1969) und bei anderen Tieren mit dotterreichen Eiern, insbesondere bei Insekten (Zusammenstellung bei ENGELMANN, 1970) nachgewiesen werden konnte.

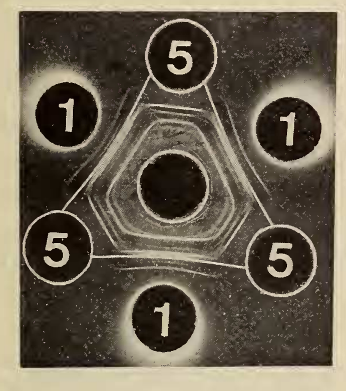


ABB. 1.

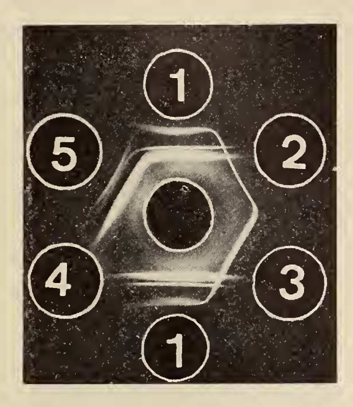


ABB. 2.

ABB. 1.

Ouchterlony-Platte. Zentrum:
Kaninchenserum gegen Haemolymphe von Eireifungsweibchen.
1 = Haemolymphe aus Eireifungsweibchen,
5 = Haemolymphe aus adulten Männchen.

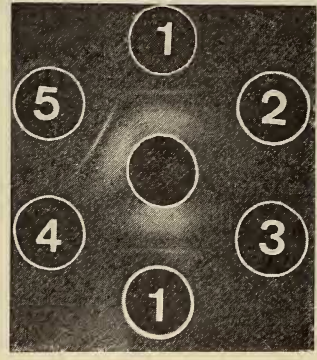
ABB. 2.

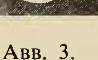
Ouchterlony-Platte. Zentrum: Kaninchenserum gegen Haemolymphe von Eireifungsweibchen. 1 = Haemolymphe aus Eireifungsweibchen, 2 = Dotterhomogenat, 3 = Vitellogeninfraktion aus Dotterhomogenat nach Fällung in niedriger Salzkonzentration, 4 = nicht fällbare Dotterproteine, 5 = Haemolymphe aus adulten Männchen.

Das Weibchenprotein lässt sich auch im Dotter der reifenden Ovarien nachweisen. Im Homogenat von Ovarien (in 0.4 molarem NaCl, Lipide und Zellfragmente abzentrifugiert) findet man Antigene, die mit denen aus der Haemolymphe von Eireifungsweibchen identisch sind, wenn man sie mit Serum gegen Eireifungsweibchen untersucht (Abb. 2). Prüft man hingegen mit Serum gegen Männchenhaemolymphe, so wird die Hauptfraktion nicht präzipitiert (Abb. 3). Im Dotter ist also eine erhebliche Menge Weibchenprotein vorhanden, das in einer immunologisch identischen Form auch in der Haemolymphe zirkuliert. Solche Proteine sind als Vitellogenine bezeichnet worden (PAN *et al.* 1969).

Ähnlich wie bei Leucophaea maderae (DEJMAL and BROOKES 1972) ist das Vitellogenin aus dem Ovarhomogenat von Nauphoeta in 0.13 molarem NaCl bei

pH 6.5 ausfällbar. Es kann so in grösserem Ausmass relativ einfach von den anderen Proteinen getrennt werden. Dies ermöglicht die Herstellung eines Antiserums, das spezifisch gegen das Vitellogenin gerichtet ist. Eine andere erfolgreiche Methode, ein spezifisches Serum zu erhalten, besteht darin, das anti-Eireifungsweibchen-Serum mit Männchenhaemolymphe im Überschuss zu absorbieren, sodass nur die Antikörper, die mit Vitellogenin reagieren, frei bleiben. Mit einem solchen Serum lässt sich die Identität von Vitellogenin aus der Haemolymphe und von Dotterhomogenat eindrücklich beweisen (Abb. 4).




Abb. 3.

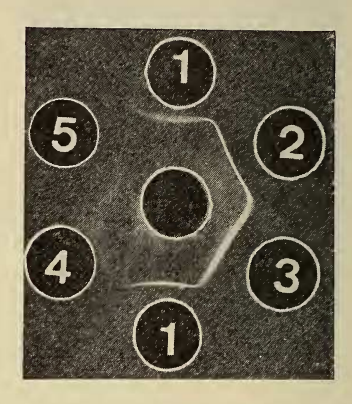


Abb. 4.

Abb. 3.

Ouchterlony-Platte. Zentrum:
Kaninchenserum gegen Männchenhaemolymphe. 1-5 wie in Abb. 2.

Abb. 4.

Ouchterlony-Platte. Zentrum:
spezifisches Serum gegen Vitellogenin. 1—5 wie in Abb. 2.

Um weitere Hinweise über die Biologie des Vitellogenis zu erhalten, wurde Eireifungsweibchen (5 Tage nach Adulthäutung) und trächtigen Weibchen (14 Tage nach Adulthäutung) 0.5 μCi eines ^{14}C-markierten Aminosäurengemisches injiziert. In bestimmten Zeitabständen wurde je ein Tier getötet und die Haemolymphe, sowie unter Eiskühlung hergestellte Homogenate von Fettkörper, Ovar, Oothek, Muskel und Darm, im Ouchterlony-Test mit dem spezifischen Serum auf Vitellogenin geprüft. Die Platten wurden sorgfältig gewaschen und so von nicht immunpräzipitiertem radioaktivem Material befreit. Alsdann wurden sie auf Röntgenfilm gelegt, die nach vier Wochen Exposition entwickelt wurden. Die Schwärzungen geben an, wo das Vitellogenin bereits radioaktiv markiert ist. Nach einer Stunde ist die Markierung im Fettkörper zu finden, eine Stunde später in der Haemolymphe und allmählich häuft sie sich in den Ovarien (Tabelle). Auch

Darm und Muskel weisen das markierte Antigen auf, allerdings erst relativ spät. Das dürfte eher von der Kontamination mit Haemolymphe herrühren als von einer Eigensynthese. Bemerkenswert ist, dass der Fettkörper das markierte Vitellogenin sehr rasch aufweist, es aber nicht akkumuliert. Bei der nahe verwandten Schabe Leucophaea maderae haben Wyss-Huber und Lüscher (1972) während der Eireifungsphase erhöhte Proteinsyntheseaktivität im Fettkörper nachweisen können. In vitro inkubierter Fettkörper baute radioaktive Aminosäuren bevorzugt in bestimmte Proteinfraktionen, darunter auch das entsprechende Vitellogenin, ein. Diese Befunde weisen alle auf die Funktion des Fettkörpers als Hauptsyntheseort für das Vitellogenin hin. In trächtigen Weibchen ist mit meiner Methode nirgends eine nennenswerte Neusynthese des Vitellogenins nachweisbar. Bemerkenswert ist ausserdem, dass nie eine radioaktive Markierung in der Oothek nachgewiesen werden konnte. Offenbar sind die Embryonen im Brutsack vollkommen vom Stoffwechsel der Mutter isoliert. Sie werden vielleicht mit Wasser versorgt, nicht aber mit freien Aminosäuren.

Tabelle

Intensität der radioaktiven Markierung von Vitellogenin in den Immunpräzipitationslinien (Autoradiographie)

Alter der Weibchen	Zeit nach Injektion	Organ					
		Fett-körper	Haemo-lymphe	Ovar	Oothek	Darm	Muskel
5 Tage Eireifung	1 Std	++	−	−		−	−
	2	++	+	−		−	−
	3	++	++	+		+	+
	5	++	++	+		+	+
	6	++	+++	++		+	+
	12	++	++	++		+	+
	2 Tage	++	+++	+++		+	+
	4	++	++	+++		+	+
14 Tage (trächtig)	1 Std	−	−	−	−	−	
	2	−	−	−	−	−	
	3	−	−	−	−	−	
	6	−	+	−	−	−	
	8	−	−	−	−	−	
	12	−	−	−	−	−	
	24	−	−	−	−	−	

Im Eireifungsweibchen zeichnet sich also folgender Prozess der Dotterbildung ab: der Fettkörper baut aus Aminosäuren Vitellogeninmoleküle auf und gibt sie an die Haemolymphe ab. Diese verbreitet sie im ganzen Körper und trägt sie auch den Ovarien zu, wo sie selektiv aufgenommen und durch Pinocytose in

die Oocyten eingelagert werden (TELFER 1965). In trächtigen Weibchen sind diese Prozesse unterdrückt.

Ausser dem kompakten Fettkörper scheinen auch die Haemocyten oder andere frei in der Haemolymphe zirkulierende Zellen an der Synthese von Vitellogenin und Haemolymphproteinen beteiligt zu zein. Dies ergibt sich aus Untersuchungen

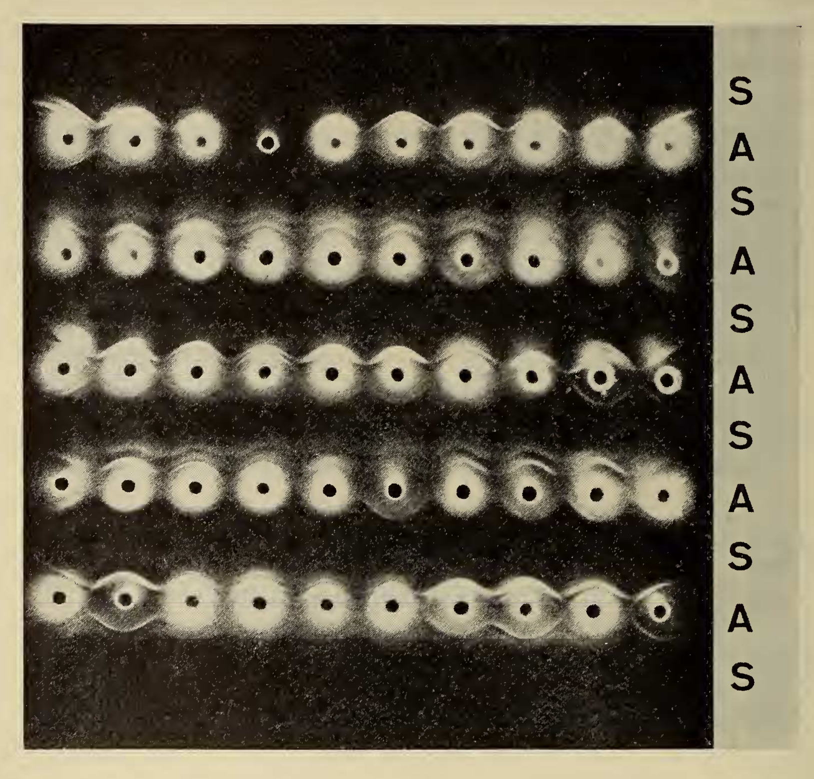


ABB. 5.

Negativ des Röntgenfilms nach drei Monaten Exposition unter Ouchterlony-Platte. Von 50 Eireifungsweibchen wurden je 10 µl Haemolymphe entnommen und mit 0.1 µCi ^{14}C-Aminosäuren in 200 µl Ringer bei 26^{0}C inkubiert. Nach 12 Stunden wurden Proben der Inkubationsmedien einzeln in die Antigenlöcher (A) abgefüllt. In die dazwischenliegenden Lochreihen wurde Kaninchenserum gegen Haemolymphe gegeben (S). Die hellen Banden stellen Antigene dar, die von den Zellen der Haemolymphe in vitro synthetisiert wurden.

mit Haemolymphproben, die in Ringerlösung mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert wurden. Anschliessend konnten im Inkubationsmedium radioaktive Haemolymphantigene (Abb. 5) und markiertes Vitellogenin (Abb. 6) nachgewiesen werden. Die Blutzellen sind folglich in der Lage, solche Proteine auch in vitro zu synthetisieren. Im Weibchen ist also während der Eireifungsphase der ganze Organismus an der Bereitstellung von Dottermaterial beteiligt.

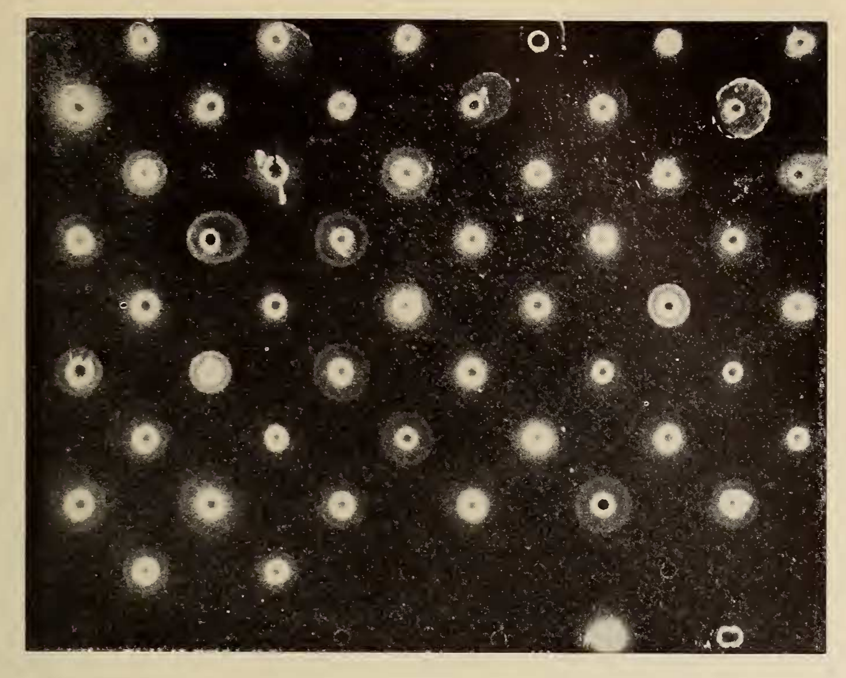


ABB. 6.

Negativ des Röntgenfilms nach drei Monaten Exposition unter Mancini-Platte mit anti-Vitellogenin-Serum. Es wurden die gleichen 50 Proben wie in Abb. 5 untersucht. Die hellen Höfe mit Rand um die Antigenlöcher zeigen, dass dort in vitro Vitellogenin synthetisiert wurde.

LITERATUR

BACKHAUSZ, R. 1967. Immunodiffusion und Immunoelektrophorese. VEB. *Gustav Fischer Verlag, Jena.*

DEJMAL, R. K. and V. J. BROOKES. 1972. Insect lipovitellin. *J. Biol. Chem.* 247: 869-874.

ENGELMANN, F. 1970. The physiology of insect reproduction. *Pergamon Press, Oxford.*

PAN, M. L., W. J. BELL and W. H. TELFER. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science* 165: 393-394.

SCHEURER, R. 1969. Endocrine control of protein synthesis during oocyte maturation in the cockroach *Leucophaea maderae. J. Insect. Physiol.* 15: 1411-1419.

TELFER, W. H. 1965. The mechanism and control of yolk formation. *Ann. Rev. Entomol.* 10: 161-184.

WYSS-HUBER, M. and M. LÜSCHER. 1972. In vitro synthesis and release of protein by fat body and ovarian tissue of *Leucophaea maderae* during the sexual cycle. *J. Insect Physiol.* 18: 689-710.